نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۸ شماره ۲/ سال۱۳۹۷/ صفحات ۸۱ تا ۹۶

# بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی سیر و میخک بر تجزیه‌پذیری ماده‌خشک و جمعیت میکروبی شکمبه گوسفند

**تقی قورچی[1*]، فرزاد قنبری[2]، مرتضی خمیری[3] و مریم ابراهیمی[3]**

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۱

[1] استاد گروه تغذیه دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[2] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه گنبد کاووس

[3] به‌ترتیب دانشیار و دانشجوی دکتری گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[*] مسئول مکاتبه: Email: ghoorchit@yahoo.com

**چکیده**

**زمینه مطالعاتی**: افزودن اسانس‌های گیاهی سیر و میخک به جیره می‌تواند اثرات مثبت بر روی گوسفند داشته باشد. **هدف**: به منظور بررسی اثرات اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر روی میکروارگانیسم‌های شکمبه وتجزیه‌پذیری ماده-خشک اجزای خوراکی جیره، دوآزمایش طراحی شد. **روش‌کار**: آزمایش اول با استفاده از سه راس گوسفند فیستوله شده در قالب طرح چرخشی گردان انجام گرفت. نمونه‌گیری و تهیه مایع شکمبه از طریق فیستولا در روز پایانی هر دوره آزمایش (روز ۲۸) و در ۳ نوبت انجام گرفت. زمان نمونه‌گیری قبل از خوراک‌دهی صبح، ۴ ساعت پس از خوراک‌دهی صبح و ۸ ساعت پس از خوراک‌دهی صبح در نظر گرفته شد. آزمایش دوم: به منظور تعیین تاثیر روغن‌های اسانسی بر تجزیه‌پذیری ماده‌خشک و تجزیه‌پذیری موثر ماده‌خشک در طرح کاملا تصادفی در قالب بلوک که سه نوع خوراک (کاه، یونجه و جو)، دو نوع اسانس‌های روغنی (سیر و میخک) و سه تکرار (۳ گوسفند فیستول شده ) استفاده شد. انکوباسیون نمونه‌های خوراکی در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انجام گرفت. **نتایج**: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد اسانس‌های روغنی میخک تاثیری بر میزان بار میکروبی شکمبه نداشت، اما اسانس روغنی سیر بار میکروبی شکمبه گوسفند را به صورت معنی‌داری کاهش داد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تعداد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک در اثر اعمال اسانس‌های روغنی سیر در جیره به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. اما تیمار میخک تاثیر معنی‌داری بر تعداد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک نداشت. روغن‌های اسانسی سیر و میخک تاثیر معنی‌داری بر تعداد باکتری‌های کلی‌فرم مایع شکمبه نداشتند ($P>0/05$) اما به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد پروتوزوآی شکمبه شدند. تعداد پروتوزوآی مایع شکمبه قبل از تغذیه صبح (زمان صفر)، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. اما ۴ و ۸ ساعت پس از تغذیه صبح اسانس‌های روغنی سیر و میخک باعث کاهش معنی‌داری تعداد پروتوزوآی مایع شکمبه شدند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس‌های روغنی سیر و میخک اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد در تجزیه‌پذیری ماده‌خشک، بخش سریع تجزیه، تجزیه‌پذیری ماده‌خشک و تجزیه ناپذیری ماده‌خشک با سرعت عبور ۲ ، ۵ و ۸ درصد درساعت داشتند . اختلاف معنی‌داری بین خوراک کاه، یونجه و جو در مقادیر تجزیه‌پذیری‌ماده-خشک و تجزیه‌ناپذیری ماده‌خشک و تجزیه‌پذیری موثر مشاهده شد. **نتیجه‌گیری نهایی**: اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر میکروارگانیسم‌های شکمبه و تجزیه‌پذیری ماده‌خشک تاثیر می‌گذارد

واژگان**کلیدی**: اسانس‌های روغنی ، سیر، میخک، تجزیه‌پذیری ماده‌خشک ، باکتری‌ها، پروتوزوآ

**مقدمه**

آنتی بیوتیک‌ها در کاهش اتلاف انرژی و پروتئین در شکمبه بسیار موثر بوده‌اند. با این وجود مصرف آنتی-بیوتیک‌ها در حیوانات بحث بر انگیز بوده است. چرا که در محصولات دامی باقی مانده و به انسان منتقل می-شوند. همچنین گونه‌های باکتریایی را مقاوم می‌سازند. بر همین اساس اتحادیه اروپا از ژانویه ۲۰۰۶ مصرف آنها را ممنوع کرده است. به این دلیل دانشمندان علاقمند شده‌اند تا دیگر افزودنی‌ها از جمله مخمرها، اسیدهای آلی اسانس‌های روغنی گیاهی، پروبیوتیک‌ها و آنتی بادی‌ها را به منظور تعدیل تخمیر در شکمبه، مورد ارزیابی قرار دهند (کالسامیگلیا و همکاران ۲۰۰۷).

اسانس‌های روغنی مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه بدست آمده از بخش فرار گیاه اطلاق می شود. این ترکیبات به وسیله عصاره‌گیری توسط بخار بدست می-آیند ( گرزنشن و کروتئا ۱۹۹۱). واژه Essential از Essen که به معنای بو یا مزه می باشد، گرفته شده است. طعم و مزه معطر بسیاری از گیاهان به دلیل وجود همین ترکیبات می‌باشد. اسانس‌های روغنی از لحاظ ساختار، ویژگی و عملکرد بسیار متنوع می‌باشند. ترپنوئیدها (مونوترپنوئیدها و سسکوئیترپنوئیدها) و فنیل پروپانوئیدها دو گروه از مهمترین ترکیب‌های شیمیایی فعال موجود در اسانس‌های گیاهی می‌باشند. این دو گروه شیمیایی از ترکیبات حاصل از متابولیسم اولیه و از طریق راه‌های متابولیکی جداگانه منشا می-گیرند. اسانس‌های روغنی در بخش‌های مختلف گیاه شامل ریشه، پوست، گل، گلبرگ، برگ، گوشت میوه و ساقه وجود دارند و ترکیب آن در بخش‌های مختلف گیاه تفاوت دارد و میزان آن به مرحله رشد گیاه و سلامت آن، فاکتورهای محیطی مانند نور، استرس، دما و رطوبت بستگی دارد (کاستلجوس و همکاران ۲۰۰۷ ).

پژوهش‌های علمی انجام گرفته در مورد اثرات اسانس-های روغنی بر روی تخمیر شکمبه‌ای کم می‌باشند. بورچرز برای اولین با ر(۱۹۶۵) سودمندی استفاده از اسانس‌های روغنی را بر تخمیر شکمبه‌ای گزارش کرد. این محقق در مطالعه *In vitro* خود مشاهده کرد که افزودن آویشن به مایع شکمبه باعث تجمع نیتروژن اسید آمینه‌ای و کاهش غلظت‌های نیتروژن آمونیاکی شد. او نتیجه گرفت که آویشن اضافه شده به محیط شکمبه باعث کاهش دی آمیناسیون شد. آسلیم و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که استفاده از روغن استخراج شده از گیاهان غیر خوش‌خوراک بطور مشخصی فعالیت باکتری‌های شکمبه و همچنین کل گاز تولیدی را کاهش می‌دهد. مک اینتوش و همکاران (۲۰۰۳) دریافتند که در بعضی حالات باکتری‌های شکمبه‌ای کشت (لاکتوباسیلوس) داده شده می‌توانند در حضور مخلوط اسانس‌های روغنی رشد نمایند.

روغن سیر مخلوطی از مولکول‌های مختلفی از جمله ترکیبات سولفوره ( تیوسولفینات، آلیل سولفیدها، گلوتامیل سیستئین‌ها و آلیسین)، آنزیم‌ها، اسید آمینه آزاد، استرول‌ها، گلیکوزیدهای ترپنوئید، فلاوونوئیدها، فنل‌ها، و ترکیبات آلی سلنیوم می‌باشد (کالسامیگلیا و همکاران ۲۰۰۷). یکی از گیاهان دارویی که اثرات ضد میکروبی وسیعی داشته و از گذشته مورد توجه بوده است، سیر است. سیر از گذشته‌های دور تا به امروز کاربرد دارویی وسیعی داشته است (روتر و همکاران ۱۹۹۶). اسانس روغنی سیر مخلوطی از ترکیبات مختلف موجود در گیاه و یا بدست آمده در حین فرآوری می-باشد. به منظور تشخیص ترکیب موثره اصلی موجود در روغن اسانسی سیر، آزمایشی توسط باسکیت و همکاران(b ۲۰۰۵) انجام گرفت. بدین منظور اثرات روغن سیر و ۴ ترکیب اصلی موجود در آن شامل آلیسین، دی آلیل سولفید، دی آلیل دی سولفید و آلیل مرکاپتان بر تخمیر شکمبه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روغن سیر، دی الیل دی سولفید و آلیل مرکاپتان نسبت استات و متان را کاهش داده و به همان میزان نسبت پروپیونات و بوتیرات را افزایش دادند. مشاهدات این محققین بیان کننده این است که دی الیل سولفید و آلیل مرکاپتان نقش اصلی را در خواص تغییر تخمیر شکمبه‌ای اسانس‌های روغنی سیر دارند. در مقابل آلیسین و دی آلیل سولفید تاثیر کمی بر تخمیر شکمبه‌ای دارند. نکته قابل توجه اینکه فعالیت ضد میکروبی سیر به ترکیبات آلی گوگرد دار موجود در آن

از جمله آلیسین نسبت داده شده است (کالسامیگلیا و همکاران ۲۰۰۷). در بین ترکیبات موجود در عصاره آبی سیر، ترکیب دی آلیل تیوسولفات موثرترین ترکیب در فعالیت‌های بیولوژیکی و ضد میکروبی سیر می‌باشد. در حقیقت مطالعات زیادی نشان داده است که فعالیت ضد میکروبی ترکیبات آلیل سولفوری اسانس روغنی سیر با اضافه شدن هر اتم گوگرد افزایش می‌یابد (روتر و همکاران ۱۹۹۶، اوگارا و همکارن ۲۰۰۰، رز و همکاران ۲۰۰۱، باسکیت و همکاران[1] ۲۰۰۵).

اسانس‌های روغنی میخک از ساقه، برگ و جوانه‌های گل درخت میخک استحصال می‌شود. مهمترین ترکیب فعال اسانس‌های روغنی میخک، اوژنول می باشد. اوژنول یا ۴ آلیل- ۲ متوکسی فنل دارای فعالیت ضد باکتریایی گسترده ای علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. این ترکیب علاوه بر اینکه در روغن میخک جود دارد، در روغن دارچین نیز وجود دارد. البته میزان این ترکیب در روغن میخک خیلی بیشتر از روغن دارچین می‌باشد. به طوری که تا ۸۵ درصد روغن میخک را اوژنول تشکیل می‌دهد، در صورتی که این ترکیب تنها به میزان ۸ درصد در دارچین وجود دارد (کالسامیگلیا و همکاران ۲۰۰۷). قنبری و همکاران (۱۳۹۲) گزارش کردند که قطر هاله عدم رشد حاصل از نانو ذرات نقره و روغن اسانسی میخک با غلظت ۸ میکرولیتر به صورت معنی‌داری بزرگتر از قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک نئومایسین بود.

در مقابل اطلاعات مربوط به تاثیر اسانس‌های روغنی بر تخمیر میکروبی شکمبه بسیار محدود است و تنها در چند سال اخیر اطلاعات قابل قبولی چاپ شده است. موضوع اکثر آنها مروری بر اطلاعات رایج، تشخیص میزان توان سودمند اسانس‌های روغنی و فعالیت ترکیبات‌شان به عنوان تعدیل کننده تخمیر میکروبی شکمبه می‌باشد.

اهداف این پژوهش بررسی اثرات اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر pH، شمارش کلی باکتری‌های، میزان باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک، میزان باکتری‌های کلی‌فرمی و تعداد، پروتوزوای شکمبه و بررسی اثرات اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری‌موثر ماده‌خشک در شکمبه گوسفند بود.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه تحقیقات دامپروری دانشکده-های علوم کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، واقع در شهرستان گرگان انجام گرفت. در این تحقیق از ۳ راس قوچ یکساله توده نژاد زل با متوسط وزن ۲±۳۵ کیلوگرم استفاده شد. قوچها از یکی از گله‌های شهرستان گرگان انتخاب شدند. دام‌ها بلافاصله بعد از ورود به ایستگاه وزن‌کشی شده و عملیات پشم چینی روی آن‌ها انجام شد. سپس در جایگاه‌های انفرادی که از قبل برای آن‌ها پیش بینی و تهیه شده بود، نگهداری شدند.

دام‌های مورد آزمایش طی مدت آزمایش، طبق روش استاندارد تکنیک کیسه‌های نایلونی در سطح نگهداری تغذیه می‌شدند تا در حین دسترسی آزاد به خوراک، حداقل میزان خوراک باقی مانده باشد. نیاز نگهداری گوسفندان از جداول استاندارد NRC (۱۹۸۵) و با توجه به مواد خوراکی موجود (یونجه خشک و جو) و وزن بدن هریک از دام‌ها تعیین گردید و جیره‌ای با انرژی و ازت یکسان فرموله شد. مدت ۲ هفته به سازگاری دام‌ها با جیره مورد نظر اختصاص داده شد. به منظور اطمینان از مصرف تمام جیره مورد نظر، جو و یونجه به طور جداگانه در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت (اسانس‌های روغنی بر روی جو اسپری می شدند). جو پس از توزین در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت. بلافاصله پس از مصرف جو علوفه یونجه خرد شده قطعات ۳ تا ۴ سانتی‌متری ، توزین و در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت. خوراک‌دهی روزانه در دو وعده مساوی در ساعت‌های ۸:۰۰ صبح و ۱۸:۰۰ عصر صورت می‌گرفت تا محیط شکمبه در شرایط نسبتا ثابتی نگه داشته شود. آب و سنگ نمک نیز به‌طور آزاد در دسترس دام‌ها قرار داشت.

در این پژوهش سیر و میخک مورد استفاده قرار گرفت و اسانس‌های مذکور از شرکت اسانس گیاه گرگان تهیه

1-Eugen

شد. روزانه مقدار ۱۱۰ میلی‌گرم از سیر و میخک در جیره دام‌ها استفاده می شد . بدین صورت که ۱۱۰ میلی‌گرم از هر کدام از اسانس‌های نامبرده در ۳۰ سی سی الکل ۷۰ درصد حل شده و در دونوبت خوراک‌دهی صبح و عصر( هر نوبت ۵۵ میلیگرم) به کنسانتزه اضافه می‌شد. طریقه اضافه کردن بدین صورت بود که ابتدا روی کنسانتره پاشیده شده و سپس با دست کاملا با خوراک مخلوط می‌شدند.

نمونه‌گیری و تهیه مایع شکمبه در روز پایانی هر دوره آزمایشی ( روز ۲۸) و در ۳ نوبت انجام می‌گرفت. جمع-آوری مایع شکمبه با استفاده از سرنگ ۶۰ میلی لیتری و شیلنگ‌هایی که انتهای آنها صافی پارچه ای بسته شده بود، از راه فیستولا صورت می‌گرفت. زمان نمونه-گیری قبل از خوراک‌دهی صبح ، ۴ ساعت پس از خوراک‌دهی صبح و ۸ ساعت پس از خوراک‌دهی صبح در نظر گرفته شد. همزمان با نمونه‌گیری ، pH مایع شکمبه با کمک دستگاه pH متر[۱] اندازه‌گیری می‌شد. بلافاصله پس از تهیه مایع شکمبه، نمونه‌ها در شیشه-های کوچک در دار تیره رنگ ریخته شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل می شد تا فراسنجه-های مختلف میکروبی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرند.

در این بخش از محیط‌های کشت تجاری MRS[۲]، VRB[۳]، BGB[۴]، PCA[۵] و PW[۶] استفاده شد. این محیط‌های کشت از نوع آزمایشگاهی بوده و همگی تولید شرکت مرک آلمان بودند.

شمارش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها ، تعداد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک، کلی‌فرم‌ها و پروتوزوآ در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و صنایع غذایی انجام گرفت .

از مایع شکمبه گوسفند، به میزان ۱۰ میلی لیتر نمونه برداشته شد و در شرایط استریل به همراه ۹۰ میلی لیتر محلول استریل پپتون واتربا دمای ۴۵ درجه سانتی گراد در دستگاه استومیکر(مدل Seaward 400، ساخت کشور آلمان) برای یک دقیقه و با دور نرمال مخلوط گردید. سپس محلول رویی به عنوان رقت $10^{-1}$ برای تهیه رقت های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. رقت‌های بعدی به طریق رقیق سازی سریالی با کمک محیط پپتون واتر تهیه شد.

به منظور شمارش مجموع میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی موجود درمایع شکمبه ، ۱ میلی لیتر از رقت-های مختلف تهیه شده بوسیله سمپلر در داخل پتری دیش استریل ریخته شد. سپس از محیط کشت PCA به میزان ۲۰ میلی لیتر داخل پتری دیش ریخته و بصورت 8 (۸ انگلیسی) حرکت داده شد تا نمونه و محیط کشت کاملا مخلوط شود. سپس پتری دیش‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرارگرفت. در پایان ۴۸ ساعت کلیه کلنی‌های رشد کرده در سطح پتری دیش شمارش شد.

به منظور کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک، ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف تهیه شده بوسیله سمپلر در داخل پتری دیش استریل ریخته شد و سپس از محیط کشت MRS به میزان ۲۰ میلی لیتر داخل پتری دیش ریخته شد و بصورت 8 (۸ انگلیسی) حرکت داده شد تا نمونه و محیط کشت کاملا مخلوط شود. پس از بستن محیط کشت، شرایط گرم‌خانه گذاری بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و گازپک (شرکت مرک آلمان و مدل A) فراهم شد و سپس پتری دیش‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. در پایان ۴۸ ساعت کلیه کلنی‌های رشد کرده در سطح پتری دیش شمارش شد.

به منظور کشت کلی‌فرم‌ها ، ۱ میلی لیتر از رقت‌های مختلف تهیه شده بوسیله سمپلر در داخل پتری دیش استریل ریخته شد. سپس از محیط کشت VRB به میزان ۲۰ میلی‌لیتر داخل پتری دیش ریخته و بصورت ۸ انگلیسی حرکت داده شد تا نمونه و محیط کشت کاملا مخلوط شود. پس از بستن محیط کشت، به مقدار ۵

---

۱ مدل Inolab 720 –

۲ De Man, Rogosa Sharpe Agar

۳ Violent Red Bile Agar

۴ Briliant Green Bile

۵ Plate Count Agar

۶ Pepton Water

میلی لیتر دیگر از محیط کشت VRB بر روی پتری دیش ریخته شد تا ببندد، سپس پتری دیش‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. در پایان ۴۸ ساعت کلیه کلنی‌های قرمز متمایل به بنفش شمارش شد و سپس ۱۰ عدد از کلنی‌ها که نماینده کلیه کلنی‌های رشد کرده در سطح پتری دیش بود انتخاب شد و هر کدام به لوله‌های حاوی محیط کشت BGB که دارای لوله دورهام است منتقل شد و برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۴۸ ساعت چنانچه در لوله ها گاز ایجاد نشد پرگنه‌های قرمز رنگ از نظر کلی‌فرم تایید نشدند. برای محاسبه جمعیت میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی، یا اسیدلاکتیک و یا کلی فرم موجود در هر میلی لیترشکمبه در هر میلی لیتر از مایع شکمبه از فرمول زیر استفاده شد(قورچی و قربانی ۱۳۹۰):

$N=(\log 10 CFU)\times D$

N= جمعیت میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی، یا اسیدلاکتیک و یا کلی فرم موجود در هر میلی لیترشکمبه

CFU=تعداد کلنی های تشکیل شده در پلیت

D=عکس رقت

با کمک پارچه ظریفی ۱۰۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبه صاف و به ۵ میلی لیتر از آن، ۵ میلی‌لیتر فرمالدهید ۱۸٪/۵ اضافه شد. سپس به ۱ میلی لیتر از نمونه آماده شده دو قطره رنگ بریلیانت گرین اضافه شده و به مدت یک شب باقی ماند. بعد از این مدت، ۹ میلی لیتر گلیسرول ۳۰٪ به نمونه اضافه و نمونه تا ۲۰ برابر رقیق شد. در نهایت به کمک لام نئوبار تعداد پروتوزوا در هر میلی لیتر از مایع شکمبه محاسبه شد.

**روش کیسه‌های نایلونی**

به منظور تعیین تاثیر بر تجزیه‌پذیری ماده‌خشک اجزای جیره از تکنیک کیسه‌های نایلونی به شرح زیر استفاده شد. در ابتدا نمونه‌های اجزای جیره شامل یونجه، کاه و جو تا رسیدن به ذرات ۲ میلی‌متری آسیاب شدند. نمونه‌های آسیاب شده به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، تا ماده-خشک آنها مورد محاسبه قرار گیرد. در این روش از کیسه‌های نایلونی با ابعاد ۶ در ۱۴ سانتیمتر و با اندازه منافذ ۵۰ میکرومتر انتخاب و به مدت ۳۰ دقیقه در آون با دمای۶۵ درجه قرار داده شدند. سپس کیسه‌ها را وزن نموده و وزن کیسه خالی به این صورت ثبت گردید. ۲ گرم از نمونه آسیاب شده توزین و در داخل کیسه‌های نایلونی قرار داده شد. سپس درب کیسه‌ها با نخ محکمی که در مقابل حمله میکروارگانیسم‌ها مقاوم است، بسته شد. کیسه‌های فوق به شیلنگی به طول ۳۰ سانتی‌متر متصل نموده و طناب بسته شده به شیلنگ به درب فیستولا محکم گردید. انکوباسیون نمونه‌های خوراکی در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انجام گرفت. پس از اتمام هر زمان انکوباسیون، کیسه‌ها از شکمبه خارج شده و شستشو می‌شدند. سپس کیسه‌های شستشو شده حاوی مقادیر باقیمانده، به مدت ۴۸ ساعت در داخل آون با دمای ۶۵ درجه قرار داده شدند.

فرآسنجه‌های مختلف تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری موثر از رابطه غیر خطی ارسکف و مک دونالد (۱۹۷۹) محاسبه شد

$P=a+b\ (1-e^{-ct})$

در این رابطه a بخش سریع تجزیه، b بخش کند تجزیه، c ثابت نرخ تجزیه در واحد زمان و P پتانسیل تجزیه-پذیری ماده‌خشک می باشد.

$ERD=a+bc\ /(c+k)$

در این رابطه a بخش سریع تجزیه، b بخش کند تجزیه، c ثابت نرخ تجزیه در واحد زمان و ERD تجزیه‌پذیری موثر ماده‌خشک می باشد و K سرعت عبور می‌باشد

**روش آماری و تجزیه و تحلیل داده ها**

به منظور تعیین تاثیر روغن‌های اسانسی بر تجزیه-پذیری ماده‌خشک و تجزیه‌پذیری موثر ماده‌خشکر طرح کاملا تصادفی در قالب بلوک که سه نوع خوراک (کاه، یونجه و جو)، دو نوع اسانس‌های روغنی (سیر و میخک) و سه تکرار (۳ گوسفند فیستول شده نژاد زل) استفاده شد.. بنابراین سه دوره آزمایشی برای طرح درنظر گرفته شد که هر دوره ۲۸ روز به طول انجامید. نمونه‌گیری از دام‌ها در روز پایانی هر دوره در زمان-های قبل از تغذیه صبح (صفر)، ۴ ساعت بعد از تغذیه

صبح و ۸ ساعت بعد از تغذیه صبح انجام می‌گرفت. داده‌های بدست آمده با استفاده نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات با استفاده از آزمون توکی- کرامر در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شد.

مدل آماری طرح مزبور به صورت زیر بود:

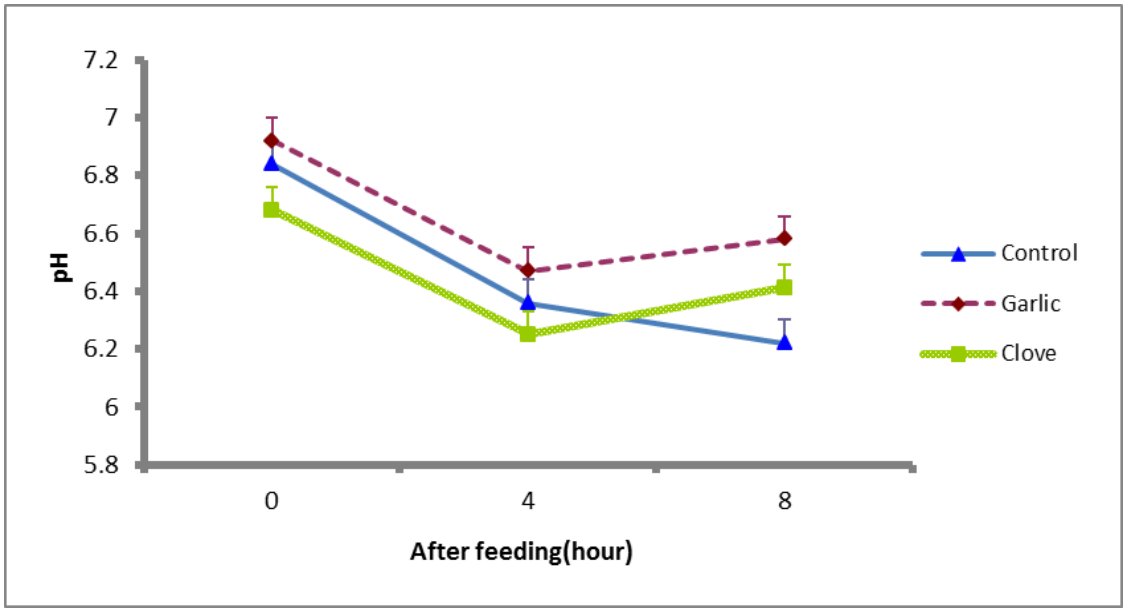
$$Y_{ijk}= \mu+ T_i +P_j+ SUB_k+\varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$= هر مشاهده از صفت مورد اندازه‌گیری ، $T_i$ =اثر ثابت iامین تیمار، $P_j$ =اثر ثابت jامین دوره، $SUB_k$ = اثر تصادفی kامین حیوان مورد آزمایش با میانگین صفر و واریانس $\sigma_a^2$، $\varepsilon_{ijk}$ = اشتباه تصادفی میانگین صفر و واریانس $\sigma_e^2$.

## نتایج و بحث

**- اثر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر pH شکمبه**

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که روغن‌های اسانسی سیر و میخک تاثیر معنی‌داری بر pH مایع شکمبه نداشتند (P>۰/۰۵) . همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، اسانس‌های روغنی سیر و میخک در هیچکدام از ساعات نمونه‌گیری تاثیر معنی‌داری بر pH شکمبه نداشتند.




**شکل ۱- تاثیر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر روی pH شکمبه گوسفند**

**Fig.1- Effect of essential oil of garlic and clove on ruminal pH in sheep**

بنچار و همکاران (۲۰۰۸) اثرات اسانس‌های روغنی را روی برخی از فرآسنجه‌های شکمبه‌ای از جمله pH در گاوهای شیری تغذیه شده با سیلاژ ذرت یا یونجه مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که مخلوط اسانس‌های روغنی تاثیری بر pH مایع شکمبه نداشت (P>۰/۰۵) . هرچند که pH در گاوهای تغذیه شده با مخلوط روغن‌های اسانسی تمایل به افزایش نشان داد (P=۰/۰۷) . این محققین مشاهده کردند که در اثر اضافه کردن مخلوط اسانس‌های روغنی غلظت کل اسیدهای-چرب در جیره بر پایه سیلاژ کاهش پیدا کرد. آن‌ها بیان کردند که این کاهش غلظت اسید های‌چرب دلیلی برای افزایش pH ( هرچند غیر معنی‌دار) مایع شکمبه‌ای می-باشد. درحالی که در جیره بر پایه سیلاژ یونجه غلظت کل اسیدهای‌چرب به آرامی افزایش پیدا کرد و این افزایش آنقدر ناچیز بود که تاثیری بر pH شکمبه‌ای نداشت. بنچار و همکاران (۲۰۰۶) pH بالاتر مایع شکمبه را در گاوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۲ گرم در روز مخلوط اسانس‌های روغنی را نسبت به گروه شاهد، گزارش کردند.

کاستجیلوس و همکاران (۲۰۰۶) اثرات ترکیبات فعال موجود در چندین اسانس‌های روغنی را روی تخمیر میکروبی و جریان مواد مغذی شکمبه در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. آنها ۴ غلظت ۵، ۵۰، ۵۰۰، و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۵ اسانس‌های روغنی را در یک دوره ۲۴ ساعته بر روی مایع شکمبه مورد بررسی قرار دادند ( مایع شکمبه از دام‌هایی که جیره با نسبت علوفه به کنسانتره ۶۰ به ۴۰ دریافت کرده بودند، گرفته شد). تیمارهای استفاده شده در آزمایش آنها شامل لیمونن، تیمول، وانیلین، اوژنول گوایاکول و یک گروه هم به عنوان شاهد بود. آن‌ها مشاهده کردند که در بالاترین غلظت همه اسانس‌های روغنی (یعنی ۵۰۰۰ میلیگرم در لیتر) pH افزایش پیدا کرد. این محققین بیان کردن که افزایش pH متعاقب کاهش غلظت کل اسیدهای‌چرب فرار اتفاق می‌افتد. علاوه بر این محققین بیان کردند که تاثیر اسانس‌های روغنی بر pH محیط شکمبه بسته به غلظت مصرفی آنها می‌باشد. چرا که در مطالعه آنها غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیچ تاثیری بر pH محیط شکمبه نگذاشت.

ایوانز و مارتین (۲۰۰۰) نیز گزارش کردند که اضافه کردن ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس‌های روغنی گیاه آویشن (تیمول) بعد از ۲۴ ساعت باعث افزایش pH در محیط آزمایشگاه شد. اما غلظت‌های پایین تر (۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تاثیری بر pH مایع شکمبه نداشت.

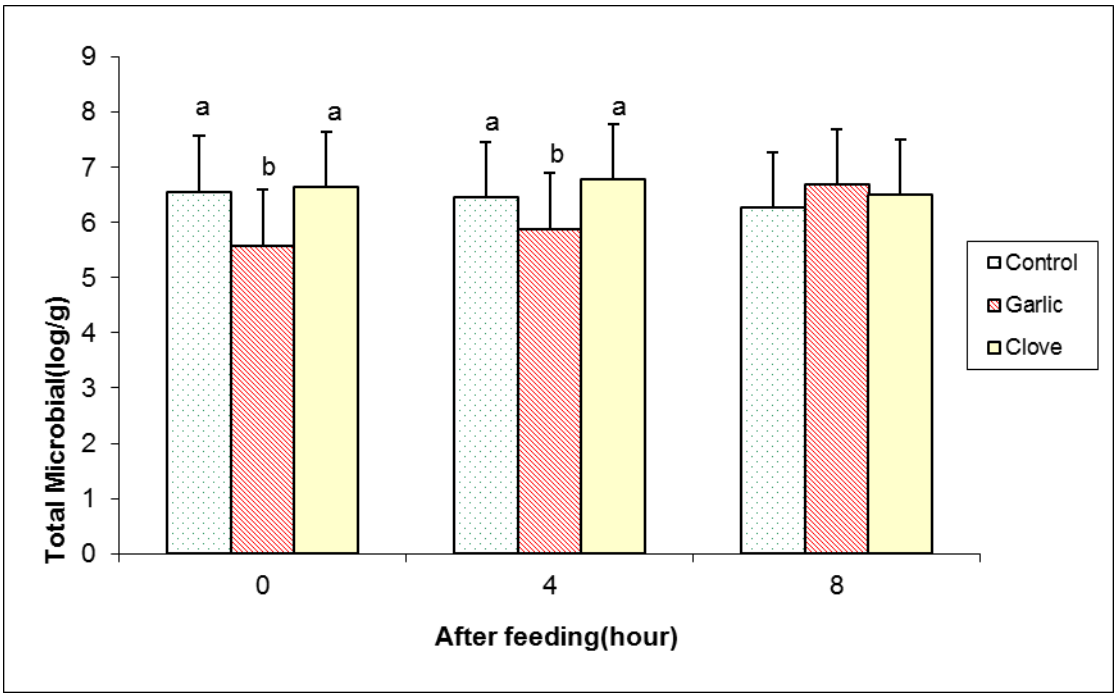
اسپانقرو و همکاران (۲۰۰۸) آزمایشی را به منظور بررسی اثرات غلظت‌های فزاینده یک مخلوط اسانس‌های روغنی روی تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. آزمایش این محققین بر روی مایع شکمبه گاوهای گوشتی و شیری انجام گرفت. برای انجام این آزمایش pH مایع شکمبه گرفته شده از گاوهای گوشتی و شیری با هیدرواکسید پتاسیم ۵ نرمال در عدد ۷ تثبیت شد. همچنین با اسید کلرید ریک ۳ نرمال pH مایع شکمبه به ۵/۵ رسانده شد. اسانس-های روغنی در دوزهای ۸، ۱۶، ۲۴ و ۳۲ میکرولیتر به مایع شکمبه در دو گروه گاو شیری و گوشتی در هر pH تهیه شده تزریق شد. نتایج نشان داد که در مایع شکمبه با pH آغازین ۵/۵، با اضافه کردن مخلوط اسانس‌های روغنی ، pH به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد.

فراسر و همکاران (۲۰۰۷) اثرات روغن برگ دارچین را روی تخمیر شکمبه‌ای در ۲ سیستم کشت ثانویه بررسی کردند. این محققین در پژوهش خود از روش شبیه‌سازی شکمبه و دیگری سیستم تخمیری با جریان دوطرفه برای بررسی اثرات روغن دارچین استفاده نمودند. نتایج نشان داد که روغن برگ دارچین در سیستم تخمیری با جریان دوطرفه بر تعداد پروتوزوآ تاثیری نداشت. اما باعث افزایش pH و کاهش غلظت کل اسیدهای‌چرب فعال در تکنیک شبیه‌سازی شکمبه شد ($P<0/01$). افزایش pH و کاهش غلظت کل اسیدهای-چرب فرار در اثر اضافه کردن روغن برگ دارچین نشان می‌دهد که این روغن باعث کاهش قابلیت تخمیر پذیری جیره در شکمبه شد. کاستجیلوس و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که دزهای بالای ( ۵۰۰۰میلی‌گرم در لیتر) اوژنول، گوایاکول، لیمونن، تیمول و وانیلین غلظت اسیدهای‌چرب را کاهش داده و متعاقباً pH افزایش پیدا کرد.

با توجه به این که تاثیر روغن‌های اسانس بر pH محیط شکمبه به دز مصرفی آنها بستگی دارد، به نظر می‌رسد که مقدار ۱۱۰ میلی‌گرم در روز اسانس‌های روغنی میخک و سیر برای تاثیر بر pH شکمبه دام‌های مورد مطالعه در این آزمایش کافی نمی‌باشد.

**اثر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر شمارش کلی باکتری‌ها**

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس روغنی سیر بار میکروبی شکمبه گوسفند را به صورت معنی-داری ($P<0/05$) کاهش داد ( شکل ۲). کاهش معنی‌دار میزان بار میکروبی شکمبه گوسفند توسط اسانس روغنی سیر تا ۴ ساعت بعد از زمان تغذیه گوسفند اتفاق افتاد. اما اسانس روغنی میخک تاثیری بر میزان بار میکروبی شکمبه نداشت ($P>0/05$).




**شکل۲- تاثیر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر روی کل میکروب های شکمبه گوسفند**

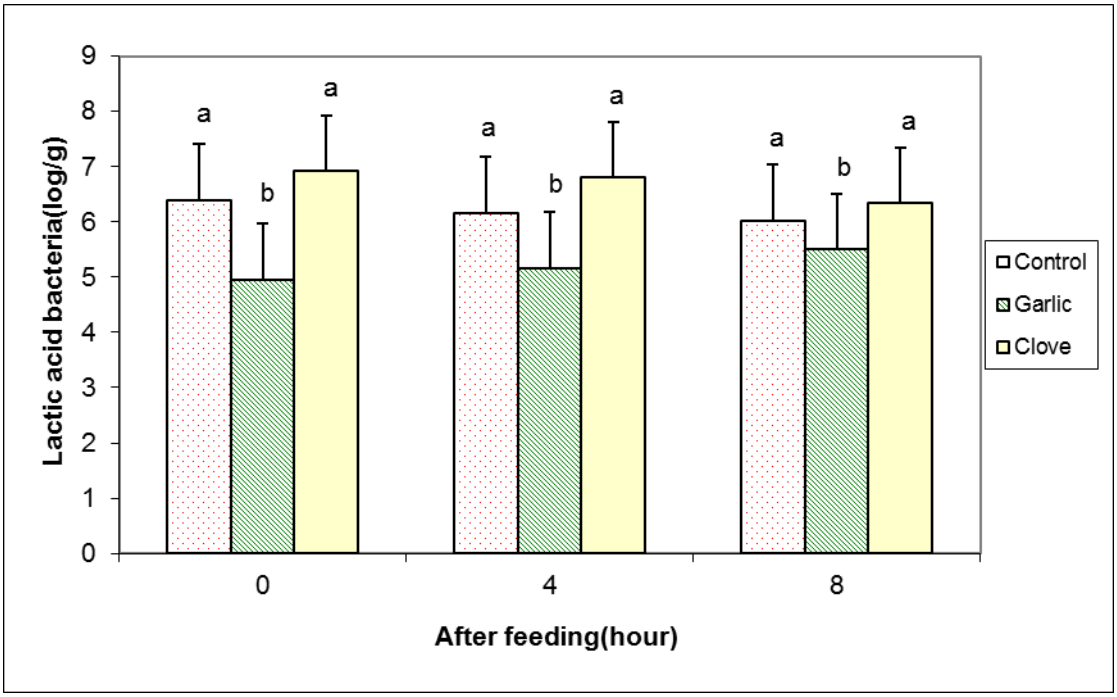
**Fig.2 -Effect of essential oil of garlic and clove on ruminal total counts microorganism in sheep**

به طور کلی در مورد اثرات اسانس‌های روغنی بر روی جمعیت میکروبی شکمبه اطلاعات کمی وجود دارد (بنچار و همکاران ۲۰۰۸). مک اینتوش و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند که اضافه کردن اسانس‌های روغنی اثر بازدارندگی بر روی بار میکروبی شکمبه گذاشت. در مطالعه‌ای که توسط بنچار و همکاران (۲۰۰۸) انجام گرفت، اضافه کردن مخلوط اسانس‌های روغنی تغییری در بار میکروبی شکمبه‌ای ایجاد نکرد. در مورد اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی مختلف، پژوهشهایی انجام گرفته است. فعالیت ضد میکروبی گیاهان مختلف بسته به ماده موثر موجود در آن‌ها متفاوت می باشد( ونلرو و سالمرون ۲۰۰۳). نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده عدم تاثیر اسانس روغنی میخک بر روی شمارش کلی باکتری‌ها می‌باشد که شاید یکی از دلایل آن به خاطر غلظت مصرفی و شرایط مورد آزمایش می‌باشد.

**اثر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر میزان باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک در شکمبه گوسفند**

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تعداد باکتری-های تولید کننده اسیدلاکتیک در اثر اعمال اسانس روغنی سیر در جیره به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش پیدا کرد. اما تیمار میخک نتوانست تاثیر معنی-داری بر تعداد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک داشته باشد (شکل۳). کاهش تعداد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک در همه زمان‌های نمونه‌گیری یعنی صفر، ۴ و ۸ ساعت بعد از وعده صبح مشاهده شد.

در زمینه اثرات اسانس‌های روغنی بر باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک گزارشی یافت نشد. با توجه به اهمیت بالای باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک بر اکولوژی شکمبه، انجام پژوهش‌های بیشتر در خصوص تاثیر اسانس‌های روغنی بر میکروبیولوژی شکمبه ضروری است.



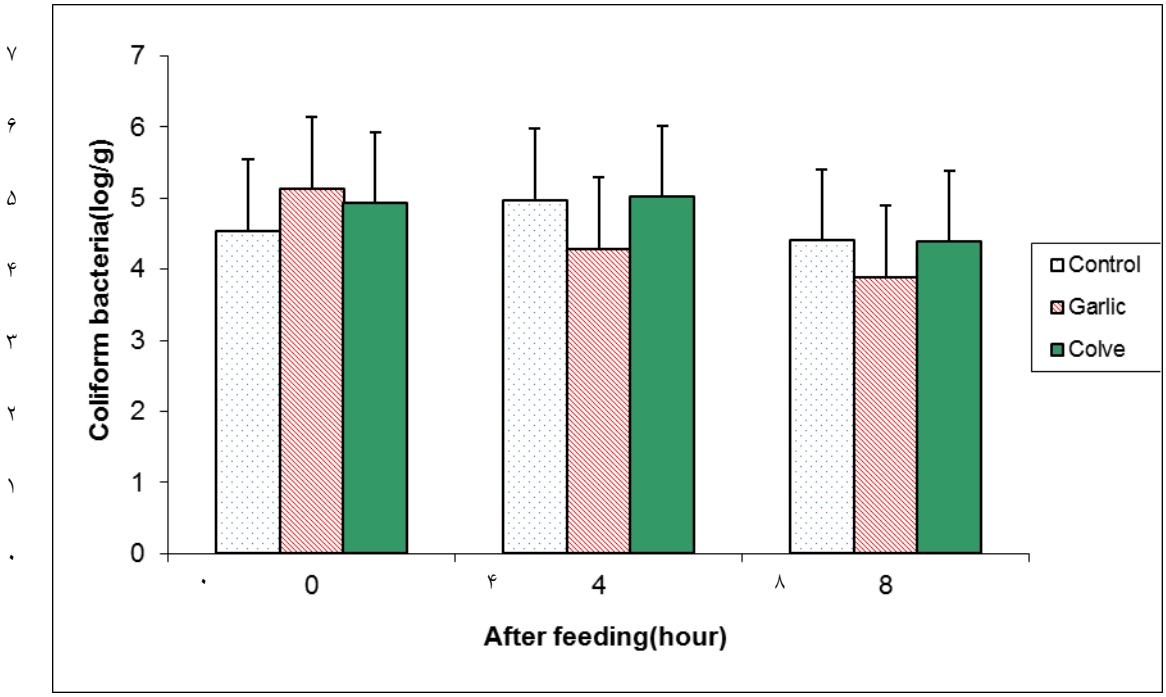

**شکل۳- تاثیر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر روی باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک شکمبه گوسفند**

**Fig.3-Effect of essential oil of garlic and clove on ruminal lactic acid bacteria in sheep**

**اثر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر میزان باکتری‌های کلی فرمی شکمبه گوسفند**

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد اسانس‌های روغنی سیر و میخک تاثیر معنی‌داری بر تعداد باکتری-های کلی‌فرمی مایع شکمبه نداشتند (P>۰/۰۵). همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، روغن‌های اسانسی سیر و میخک در هیچکدام از ساعات نمونه‌گیری تاثیر معنی‌داری بر تعداد باکتری‌های کلی‌فرمی مایع شکمبه نداشتند.

درمطالعات آزمایشگاهی مشخص شد که اسانس روغنی میخک اشرشیاکلی را از بین می برد (فرد من و همکاران۲۰۰۲). یوجی و همکاران (۲۰۰۷)، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی میخک و رزماری را علیه کلی‌فرم‌ها نشان دادند. بر اساس نتایج بدست آمده، حداقل غلظت بازدارندگی اسانس روغنی میخک از ۰/۰۶۲ درصد تا ۰/۵ درصد و حداقل غلظت بازدارندگی رزماری از ۰/۱۲۵ درصد تا ۱ درصد بود. جیسلن و همکاران (۲۰۰۰)، اثر ضد میکروبی اسانس‌های روغنی بومادران، میخک، بادرنجبویه، ریحان، انار، رزماری، آویشن و ترکیبات اسید بنزوئیک، اسید سینامیک، اوژنول و فارسنول را بر باکتری‌های کلی فرمی شامل *E.coli* بررسی کردند. هیچکدام از روغن‌های اسانسی مورد استفاده بر باکتری‌های کلی‌فرمی تاثیری نداشتند. آروا و کائور( ۱۹۹۹) در مطالعه ای اثرات ضد میکروبی گیاهان مختلف را بر روی میکروب‌های گوناگون مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها تنها اثرات باکتری‌کشی اسانس‌های سیر و میخک را بر روی سالمونلا تیفی-موریوم مشاهده کردند. این دو اسانس بر روی کلی-فرم‌ها و دیگر باکتری‌های مورد آزمون تاثیری نداشتند. بورت (۲۰۰۴)، اثر بازدارندگی ترکیب اوژنول را بر روی *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes*، *Shigella dysenteria* و *Bacillus cereus* با سطوح ۰/۲ تا µ l/ml ۱۰ بررسی کرد. نتایج بررسی وی نشان داد که باکتری‌های گرم منفی بطور معنی‌داری حساسیت کمتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند. حداقل غلظت کشندگی اوژنول از ۰/۰۵ تا ۵l/ml µ در شرایط آزمایشگاهی بود.



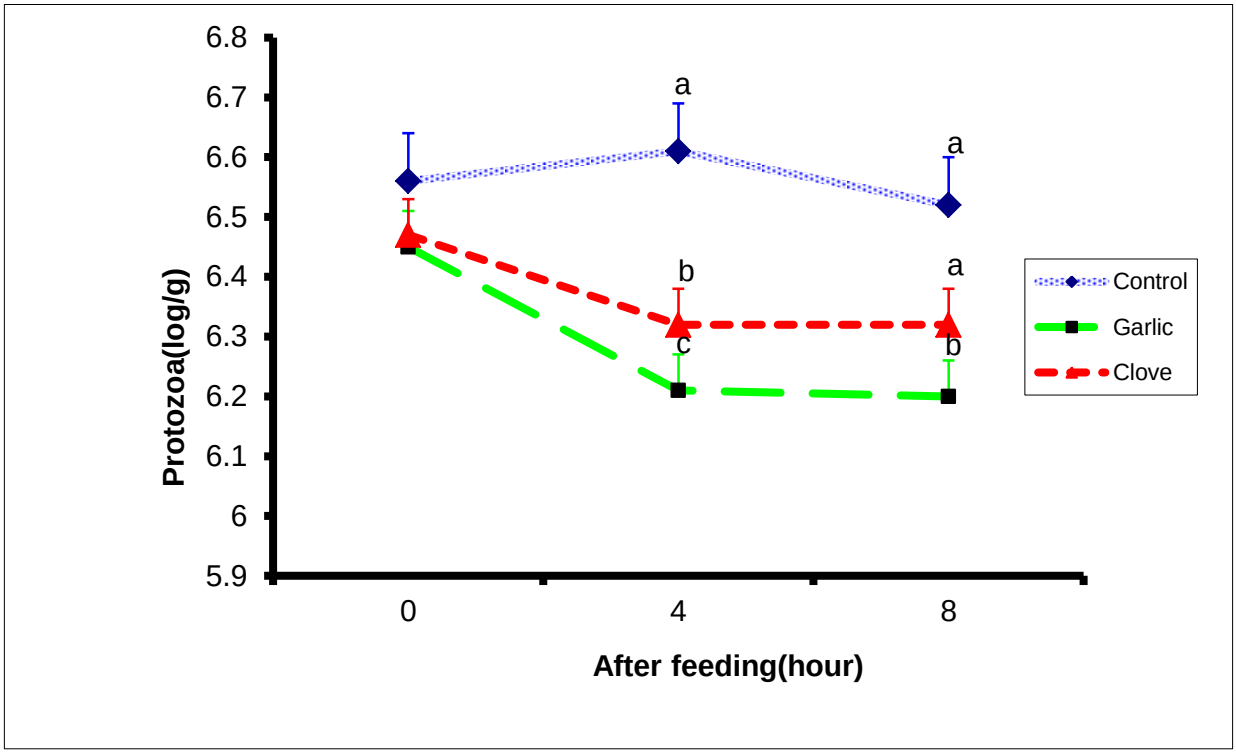

**شکل۴- تاثیر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر روی باکتری‌های کلی فرم شکمبه گوسفند**

**Fig.4-Effect of essential oil of garlic and clove on ruminal coliform in sheep**

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده عدم تاثیر اسانس‌های روغنی میخک بر روی بار میکروبی کل و کلی‌فرم‌ها می‌باشد که شاید یکی از دلایل آن بخاطر شرایط مورد آزمایش می‌باشد. در تحقیقات ذکر شده اثر ضد میکروبی اسانس میخک تنها با حضور میکروارگانسیم مورد نظر و با کمک محیط‌های کشت سنتزی و یا مایع شکمبه در شرایط کاملا کنترل شده آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت در صورتی‌که در تحقیق حاضر اثر ضد میکروبی اسانس در بدن گوسفند زنده مورد ارزیابی قرار گرفت که طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات شناخته شده و ناشناخته حضور دارند و می‌توانند مانع از فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی میخک در مایع شکمبه شوند و همچنین نباید تاثیر شرایط محیطی و دز مصرفی را نادیده گرفت.

**اثر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر تعداد پروتوزوآی شکمبه**

نتایج حاص از این پژوهش نشان داد که اسانس روغنی سیر و میخک به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد پروتوزوآی شکمبه شدند ($P<۰/۰۵$). همانگونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، تعداد پروتوزوآی مایع شکمبه قبل از تغذیه صبح (زمان صفر)، تفاوت معنی‌داری با شاهد ندارد. اما ۴ و ۸ ساعت پس از تغذیه صبح، اسانس‌های روغنی سیر و میخک باعث کاهش معنی دار تعداد پروتوزوآی مایع شکمبه شده اند.




**شکل۵- تاثیر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر روی پروتوزوآ شکمبه گوسفند**

**Fig.5- Effect of essential oil of garlic and clove on ruminal protozoa in sheep**

فعالیت ضد پروتوزوآیی برخی اسانس‌های روغنی مشاهده شده است ( پاترا و همکاران ۲۰۰۶). آگراوال و همکاران (۲۰۰۹) در یک پژوهش درون آزمایشگاهی اثرات سطوح مختلف( ۰، ۰/۳۳، ۱ و میکرولیتر در لیتر) روغن نعناع را روی متان‌زایی و تخمیر خوراک، با استفاده از لیکور شکمبه گاومیش مورد بررسی قرار دادند. این محققین مشاهده کردند که با افزایش سطح نعناع، تعداد پروتوزوای هولوتریش و اپیروتریش به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P<0/01$). فراسر و همکاران (۲۰۰۷) اثرات روغن برگ دارچین را روی تخمیر شکمبه‌ای در ۲ سیستم کشت ثانویه بررسی کردند. این محققین در پژوهش خود از روش شبیه-سازی شکمبه و دیگری سیستم تخمیری با جریان دوطرفه برای بررسی اثرات روغن دارچین استفاده نمودند. نتایج نشان داد که روغن برگ دارچین در سیستم تخمیری با جریان دوطرفه بر تعداد پروتوزوآ تاثیری نداشت. اما باعث کاهش تعدا پروتوزوآ در روش شبیه‌سازی شکمبه شد ($P<0/01$). این محققین کاهش هضم فیبر در مطالعه خود را به کاهش تعداد پروتوزوآ نسبت دادند. به نظر می‌رسد که پروتوزوآی شکمبه‌ای سکونتگاه حدود ۲۰ درصد از باکتری‌های تولید کننده متان می‌باشند. باکتری‌های تولید کننده متان که درون و بیرون پروتوزوآ زندگی می کنند، مسئول تولید ۳۷ در صد از متان می‌باشند.

برخلاف پژوهش حاضر نیوبولد و همکاران (۲۰۰۴) و بنچار و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۸) هیچ تغییری در تعداد پروتوزوآی گاوها و گوسفندان تغذیه شده با مخلوط در غلظت‌های ۱۰۰ میلی گرم و ۲ گرم در روز مشاهده نکردند. غلظت مصرفی اسانس‌های مورد استفاده نقش بسیار مهمی در اثرات آنها بر ویژگی‌های شکمبه از جمله تعداد پروتوزوآی آن دارد (فراسر و همکاران۲۰۰۷).

**تجزیه‌پذیری ماده‌خشک**

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس‌های روغنی سیر و میخک اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد در تجزیه‌پذیری ماده‌خشک، بخش سریع تجزیه، تجزیه-

پذیری ماده‌خشک و تجزیه‌ناپذیری ماده‌خشک با سرعت عبور ۲٪ ، ۵٪ و۸٪ درساعت داشتند ( P<۰/۰۵) (جدول۱).

**جدول۱- تاثیر اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر روی تجزیه پذیری و تجزیه پذیری ماده‌خشک خوراک‌ها مختلف**

**Table1- Effects of essential oil of garlic and clove on dry matter degradability in some feed**

| | Degradability | | | Effective ruminal degrability of dry matter | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Feed | a (%) | b (%) | a+b(%) | 0.02($h^{-1}$) | 0.05($h^{-1}$) | 0.08($h^{-1}$) |
| Straw | 11.35$^{f}$ | 36.70$^{abc}$ | 48.05$^{ef}$ | 39.95$^{ef}$ | 34.45$^{dc}$ | 31.80$^{e}$ |
| Straw+Garlic | 11.95$^{f}$ | 35.10$^{bc}$ | 47.05$^{ef}$ | 37.25$^{fg}$ | 29.95$^{de}$ | 25.75$^{dc}$ |
| Straw+Clove | 11.35$^{f}$ | 33.85$^{c}$ | 45.20$^{f}$ | 35.70$^{g}$ | 28.50$^{e}$ | 24.60$^{d}$ |
| Alfalfa | 16.70$^{d}$ | 40.05$^{a}$ | 56.75$^{c}$ | 45.35$^{d}$ | 36.80$^{c}$ | 32.15$^{c}$ |
| Alfalfa+Garlic | 14.60$^{e}$ | 37.40$^{abc}$ | 52.00$^{d}$ | 41.55$^{e}$ | 33.55d$^{ce}$ | 29.25$^{dc}$ |
| Alfalfa+Clove | 11.75$^{f}$ | 38.20$^{ab}$ | 49.95$^{ed}$ | 39.30$^{ef}$ | 31.15$^{de}$ | 26.75$^{dc}$ |
| Barley | 46.75 $^{a}$ | 39.55$^{a}$ | 86.30$^{a}$ | 74.90$^{a}$ | 66.45$^{a}$ | 61.90$^{a}$ |
| Barley+Garlic | 44.85$^{b}$ | 40.00$^{a}$ | 84.85$^{a}$ | 71.20$^{b}$ | 62.40$^{abb}$ | 57.95$^{ab}$ |
| Barley+Garlic | 43.42$^{c}$ | 38.60$^{ab}$ | 82.00$^{b}$ | 67.50$^{c}$ | 58.80$^{b}$ | 54.75$^{b}$ |

**اعدادی که در ستون حروف مشابه ندارند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵، دانکن).**

The mean within the same column with at least one common letter, do not have significant difference (P>0.05, Duncan).

با توجه به اطلاعات این پژوهش تاثیر اسانس‌های روغنی بر جمعیت میکروبی در ساعت‌های مختلف و نوع اسانس مشاهده شد. که ممکن است باعث کاهش تجزیه-پذیری شود. ازروش کیسه‌های نایلونی به منظور مطالعه اثرات روی متابولیسم نیتروژن استفاده شده است. مولر و همکاران (۲۰۰۴) از تلیسه‌های در حال رشد به منظور ارزیابی اثر مخلوط (۷۰۰ میلیگرم در روز) بر تجزیه‌پذیری پروتئین‌های کنجاله سویا، خوراک گلوتن ذرت، کنجاله ماهی، نخود سبز، کنجاله آفتابگردان و دانه‌های باقلای مصری استفاده کردند. مخلوط تنها باعث کاهش جزئی در تجزیه‌پذیری موثر کنجاله سویا، نخود سبز و دانه باقلا شد. نیوبولد و همکاران (۲۰۰۴) و بنچار و همکاران (۲۰۰۶) تغییری درکینتیک تجزیه پروتئین کنجاله سویا در شکمبه گوسفند و گاوشیری که به ترتیب میزان ۱۱۰ میلی‌گرم و ۲ گرم اسانس روغنی دریافت کردند، مشاهده نکردند. عدم تاثیر روی متابولیسم نیتروژن در مطالعات نسبتا طولانی مدت کیسه‌های نایلونی و درون تنی نسبت به مطالعات کوتاه مدت تر آزمایشگاهی ممکن است در ارتباط با طول دوره‌ای باشد که باکتری‌های شکمبه‌ای در معرض قرار می‌گیرد. زمان‌های طولانی تر حضور ممکن است که باعث تغییر جمعیت‌های میکروبی شده و امکان دارد که برخی از ترکیبات به وسیله باکتری‌های شکمبه‌ای تجزیه شود. کاردوزو و همکاران (۲۰۰۴) و باسکت و همکاران (a ۲۰۰۵) مشاهده کردند که برخی از اثرات و ترکیبات اصلی آنها روی تخمیر میکروبی شکمبه تاثیر دارد.

## نتیجه گیری کلی

در این پژوهش مشخص شد که اسانس‌های روغنی سیر و میخک بر میکروارگانیسم‌های شکمبه تاثیر گذاشته و در نتیجه توانایی تغییر فرآیند تخمیر از طریق تغییر جمعیت میکروارگانیسم‌های مختلف در شکمبه را دارند. با توجه به لزوم بهبود فرآیند تخمیر در شکمبه به منظورافزایش کارایی استفاده از انرژی و مواد مغذی، به نظر می‌رسد که استفاده از روغن‌های اسانسی در این خصوص مفید می‌باشد.

**منابع مورد استفاده**


Agarwal N, Shekhar C, Kumar R, Chaudhary LC and Kamra DN, 2009. Effect of peppermint oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Animal Feed Science and Technology 148:321-327.

Aroa DS and Kaur J, 1999. Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial Agents 12:257-262.

Aslim B and Yucel N, 2008. *In vitro* antimicrobial activity of essential oil from endmic organum minutiflorum on ciprofloxacin-resistant Campylobacter SPP. Food Chemistry 107:602-606.

Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA and Beauchemin KA, 2008. A review of plant-derived essential oils in rumination nutrition and production. Animal Feed Science and Technology 145:209-228.

Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Whyte TD and Chouinard PY, 2006. Effect of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermention, milk production, and milk composition in dairy cows. Journal of Dairy Science 89:4352-4364.

Borchers R, 1965. Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. Journal of Aminal Science 49:1101-1111.

Burt S, 2004. Essential oil: Their antibacterial properties and potential application in foods – A review. International Journal of Food Microbiology 94:223-253.

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Cardozo PW and Kamel C, 2005a. Effect of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. Journal of Dairy Science 88:2508-2516.

Busquet M. Calsamiglia S, Ferret A, Carro MD and Kamel C, 2005b. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science 88:4393-4404.

Casamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L and FerretA, 2007. Invited Reviw: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. American Dairy Science Association 90:2580-2595.

Cardazo PW, Calsamiglia S, Ferret A and Kamel C, 2004. Effect of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture Journal of Aminal Science 82:3230-3236.

Castillejos L, Calsamiglia S and Ferret A, 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. American Dairy Science Association 89: 2649-2658.

Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A and Losa R, 2007. Effect of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 132:186-201.

Evans JD and Martin S A, 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. Current Microbiology, 41:336–340.

Fraser G R, Chaves AV, Wang Y, McAllister TA, Beauchemin KA and Benchaar C, 2007. Assessment of the effects cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. American Dairy Science Association 90:2315-2328.

Friedman M, Henika PR and Mandrell R E, 2002. Bacterial activities of plant essential oils and some of their isolated constituent against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *listeria moncytogenes*, and *Slmonella entrica*. Journal of Food Protection 65:1545-1560.

Gershenzon J, and Croteau R, 1991. Terpenoids. Pages 165–219 in Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. Vol. 1. Rosenthal, G. A., and Berenbaum, M. R. Academic Press, San Diego, CA.

Ghanbari F, Ghoorchi T, Ebrahimi M and Arbabi S, 2014. Determination the chemical compositions of the garlic and clove essential oils by gas chromatography and compare their antimicrobial activity with nanosilver and antibiotic. Journal of Ruminant Research 4:65-79. (In Persian).

Ghoorchi T, and Ghanbari F, 2011. Rumen Microbiology. 169pp. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Press (In Persian).

Mcintosh FM, Williams P, Losa R, WallaceR J, Beever DA and Newbold CJ, 2003. Effect of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. Applied and Environmental Microbiology 69: 5011-5014.

Molero R, Ibars A, Calsamiglia S, Ferret A and Losa R, 2004. Effect of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diet with different forage to concentrate ratio. Animal Feed Science and Technology 114:91-104.

National Research Council. 1985. Nutrient Requirements of Sheep, 6th ed. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.

Newbold CJ, McIntosch, FM, Williams P, Losa R and Wallace RJ, 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 114:105–112.

O'Gara EA, Hill DJ, and Maslin DJ, 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents

Orskov ER, and McDonald Y, 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from determining the digestibility of feeds in the rumen. Journal Agricultural Science, Cambridge. 92:499-503.

Patra AK, Kamra DN, and Agarwal N, 2006 Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Animal Feed Science and Technology 128: 276–291.

Reuter H D, Koch J P, and Lawson L, 1996. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. Pages 135–212 in Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum L.* and Related Species. H. P. Koch and L. D. Lawson. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV and Maslin DJ, 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. Applied and Environmental Microbiology 67:475–480.

Spanghero M, Zanfi C, Fabbro E, Scicutella N and Camellini C, 2008. Effects of a blend of essential oils on some end products of *in vitro* rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology145:364-374.

Vanlero M and Salmeron MC, 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils agints Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. Journal of Food Microbialogy 85:73-81.

# An investigation on the effect of different essential oils on feed intake and sheep rumen microbial population

**T Ghoorchi[1*], F Ghanbari[2], M Khomeiri[3] and M Ebrahimi[4]**

Received: August 24, 2016 Accepted: January 31, 2018
[1]Professor, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Assistant Professor, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
[3]Associate Professor and PhD Student, Respectivly, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran
[*]Corresponding author: Email: ghoorchit@yahoo.com

**Introdution:** A goal of ruminant microbiologists and nutritionists is to manipulate the ruminal microbial ecosystems to improve the efficiency of converting feed to animal products consumable by humans. The use of feed additives such as antibiotics has proven to be a useful tool to reduce energy (in the form of methane) and nitrogen (in the form of ammonia) losses from the diet. However, scientists have recently become interested in evaluating alternatives for manipulating the gastrointestinal microflora in livestock due to the increasing public concern about the use of antibiotics in the animal feed industry. Plant extracts have been used for centuries for various purposes (e.g., traditional medicine, industrial applications, food preservatives) due to their antimicrobial properties and because most of them are categorized as GRAS (Generally Recognized as Safe) for human consumption. The use of plant extracts appears to be one of the most natural alternatives to the antibiotic use in animal nutrition. Ruminant microbiologists and nutritionists have been exploring alternative methods of favorably altering ruminal metabolism to improve feed efficiency and animal productivity. Plant extracts contain secondary metabolites, such as essential oils (EO) that have antimicrobial properties that make them potential alternatives to antibiotics to manipulate micro-bial activity in the rumen. Essential oils are naturally occurring volatile components responsible for giving plants and spices their characteristic essence and color. Over the last few years, a number of studies have examined effects of EO, and their active components, on rumen microbial fermentation. Garlic oil (*Allium sativa*) and clove has been shown to exhibit a wide spectrum of antibacterial activity against gram-negative and gram-positive bacteria. In a previous study, garlic oil and clove reduced the proportions of acetate and branched-chain VFA, and increased the proportions of propionate and butyrate and the small peptide plus amino acid N (SPep+AA N) concentration. These changes in the fermentation profile are consistent with those observed with methane inhibitors and have the potential to beneficially modify rumen microbial fermentation. In order to evaluate effects of garlic and clove essential oils on rumen microorganisms, dry matter degradability of ingrediends, two experiments were designed.

**Material and metheds:** First experiment was carried out with three fistulated rams using change over design. Each period lasted 28d. Ruminal fluid was collected in the end of each period. Samplings were performed immediately before and after 2 and 4 hours of morning feeding. In second experiment: an experiment with randomized complete block design containing 3 kinds of feed (straw, alfa alfa, barley) and 2 kinds of essential oils (garlic, clove) in 3 replicates (3 fistulatted sheep) was conducted to determine effects of essential oil on degradability and effective degradability of dry matter. Incubation of feed samples was done in times of 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours.

**Results and discussion:** The results showed that differences of pH were not significant among treatments. Clove essential oil did not show any effect on total counts of microorganisms, but garlic essential oil significantly reduced rumen total counts. Results of the experiment indicated that by using garlic essential oil in diet, numbers of producing lactic acid bacteria was significantly reduced but clove treatment didn't affect numbers of producing lactic acid bacteria. Reduction in producing bacteria was observed in all the samples. Garlic and clove essential oil had not significant effect on the number of rumen coliform bacteria, but significantly decreased rumen protozoa bacteria. Number of rumen fluid protozoa was not significantly different from control before morning nutrition (time zero), but 4 and 8 hours after morning feeding, garlic and clove essential oil, significantly reduced rumen fluid protozoa. The results of this experiment showed that garlic and clove essential oil had significant difference with control in dry matter degradability, A, dry matter undegradibility and dry matter effective degradability by passage rate of 2%, 5%, 8% an hour.

Significant difference was observed between straw, alfa alfa and barley in dry matter degradability, dry matter undegradibility and effective degradability.

**Conclusion:** According to the results mentioned that garlic and clove essential oil effected on rumen microorganisms and dry matter degradibility. Plant-derived EO may be a useful means to improve efficiency of nutrient utilization in ruminants and reduce the impact of their production on the environment. At high doses, EO and their constituents may inhibit deamination of AA and reduce methane production in the rumen. The range of EO and their components is complex in terms of nature and activity and variability in their composition may make it difficult to obtain consistent positive responses in ruminant production from these complex mixtures.

**Key words**: essential oil, garlic, clove, rumen microorganism, degradability